

## *Aspergillus niger* 고정화 캡슐을 이용한 구연산 생산 특성

정 수 환 · 이 태 중 · 박 중 곤 · \*장 호 남  
경북대학교 공과대학 화학공학과  
\*한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터

## Citric Acid Production Using Encapsulated *Aspergillus niger*

Soo Hwan Cheong, Tae Jong Lee, Joong Kon Park and \*Ho Nam Chang

Department of Chemical Engineering, college of Engineering  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea  
\*Department of Chemical Engineering and BPERC,  
KAIST, Taejeon 305-701, Korea

### ABSTRACT

The encapsulated *A. niger* grew up inside the capsule and mycelia penetrated through the pore of the capsule membrane. The mycelia on the capsule wall became loose when the carbon source and oxygen were deficient in the medium. On the contrary, the production rate increased and mycelia made a lump tightly when the carbon source and oxygen were sufficient. Namely, number of proper capsule of unit volume in the medium was existed. The phenomenon which was swelled of capsule membrane in cultivation could be prevented by adding  $\text{CaCl}_2$  into the medium. According to the time adding  $\text{CaCl}_2$  into the medium, the production rate of citric acid was influenced. In case of adding  $\text{CaCl}_2$  into the medium at 7th day cultivation, the production yield of citric acid was increased about 40 percent higher than that of adding  $\text{CaCl}_2$  initially. The production yield of citric acid using encapsulated *A. niger* of flask culture was influenced with oxygen supply. The production yield of citric acid ( $\Delta p/\Delta s$ ) of the flask culture was increased 3.88 time by using T-flask instead of parafilm sealed flask. Therefore, the productivity and consumption rate concerning production which was taken carbon source were increased when oxygen supply was sufficient. The production of citric acid using encapsulated *A. niger* was increased average 30 percent higher than that of bead in between 6th and 13th day cultivation.

### 서 론

균체를 고농도로 하여 생산성을 높일 수 있는 방법으로 발효조내의 균체를 고정화하는 방법이 있다(1). 현재까지의 고농도 배양을 위한 미생물의 고정화 방법에는 크게 세 가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째는 폴리우레탄이나 셀라이트 등의 담체에 미생물을 부착시키는 방법이고(2), 둘째는 alginate, chitosan,

collagen 등에 미생물을 함께 섞어서 담체를 제조하고 담체내에서 미생물을 배양, 생산하는 방식이다(3-4). 셋째는 막을 이용하는 것으로서 hollow fiber 막 속(5)이나 캡슐 속에 미생물을 가두어서 사용하는 방식이다(6-7). 균체를 고농도화하는 방법으로서 비교적 효과적인 방법으로 간주되는 것이 고분자 물질의 bead내에 미생물을 고정화 배양하는 방법이 있다. 그러나 bead에 미생물을 고정화 배양하는 경우

일반적으로 몇 가지 문제를 안고 있다. 담체에 부착된 미생물이나 담체내에 포함된 미생물들이 성장하여 담체 밖으로 스며나오게 되어 용액중으로 씻겨져 나오게 된다. 그리고 미생물이 담체의 표면과 담체내의 공극에서만 배양이 가능하므로 미생물의 배양 영역이 매우 작으며 담체의 중심 부근에서는 영양분 및 산소공급의 부족 등으로 미생물 생존이 불가능한 영역도 생겨날 수 있다(8). 이러한 문제점을 해결하기 위해서 최근 고정화 효소 등에 이용된 캡슐 내에 미생물이 고정화되어진다면 가장 이상적인 미생물 고정화법이 될 가능성이 있다.

캡슐 고정화는 초기에 효소나 약물 등의 체내 투여와 관련되어 연구되었다가(9), F. Lim에 의해 완화된 조건에서 살아 있는 동물 세포를 2단계 캡슐화하는 방법이 개발되어(10-11) 많은 종류의 동물 세포가 캡슐화 된 후 배양되어 왔다. 그 후 Wang 등(12)에 의하여 calcium chloride 현탁용액을 알지네이트 용액에 떨어뜨려 캡슐을 제조하는 1단계 캡슐제조법이 개발되었다. 최근 Cheong 등(13-14)은 1단계 캡슐제조법을 이용하여 *S. cerevisiae*를 고정화 배양하여 제반 특성을 고찰한 바 있었다. *S. cerevisiae*를 고정화한 경우 발효과정에서 발생하는 이산화탄소로 인하여 캡슐이 파괴되는 현상이 관찰되었다. 그러나 캡슐막 제조시 고분자막에 계면활성제를 내포시켜 이산화탄소의 투과 속도를 1.7배 이상 증가시켜 발효 중 막의 파괴를 방지할 수 있었다. 또한 배지내에 미량의 calcium chloride를 첨가하여 발효중 막이 팽창하는 것을 방지할 수 있었고 그 결과 캡슐 내부의 미생물 건조중량은 310g/l 에 달하였다. 기존의 bead를 이용한 효모고정화법에서는 bead 내부의 미생물은 bead 외부의 배지에 대한 격리효과를 전혀 기대할 수 없었지만 캡슐 내부의 미생물은 캡슐 외부의 배지에 대하여 격리효과가 완벽하였다. 에탄올 생산의 연속공정에서 격리효과가 완벽하여 미생물이 배지에는 전혀 존재하지 않음에도 불구하고 고정화 bead를 이용한 경우와 에탄올 생산성이 거의 같았다.

*S. cerevisiae*에 의한 에탄올 생산은 혐기성 공정이며 미생물이 2~5 $\mu$ m로 독립된 개체이다. 그러나 미생물중의 큰 분야를 차지하는 곰팡이류는 호기성 균주이며 균사를 형성하여 성장한다. 따라서 널리 알려진 구연산을 생성하는 *Aspergillus niger*를 선택하여 캡슐 내부에 고정화하고 그 배양 특성을 고찰하고자 한다. 본 연구에서는 캡슐내 *A. niger*의 고정화 및 성장양태, 배지내의 구성요소에 따른 생산

양태, 배지내의 적정 캡슐수 및 산소공급량에 따른 생산성 변화 등을 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Aspergillus niger* (KCTC 1232)로서 유전공학연구소에서 분양받았으며 균주의 활성을 유지하기 위해서 potato dextrose agar 배지에서 1개월마다 계대배양하였다. 사용한 배지의 조성(15)은 Sucrose 60g/l,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2.5g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g/l 이고, seed culture는 250 ml의 삼각플라스크에 배지를 30ml 넣고 121 $^\circ\text{C}$  에서 15분 동안 멸균한 후 agar slant에서 포자를 접종하여 30 $^\circ\text{C}$ , 120rpm의 조건으로 shaking incubator에서 2일 동안 배양하였다.

### 캡슐 제조 및 미생물 고정화

Calcium-alginate 캡슐 제조에 사용된 재료는 sodium alginate(Yakuri, LOT 311304),  $\text{CaCl}_2$  (Duksan, LOT 712101), xanthan gum(Sigma, 40H0742) 및 surfactant 이다.

캡슐의 제조방법은 먼저 0.6%(w/v) sodium alginate 용액을 준비하였다. 또한 용액 1당 13g의 calcium chloride와 0.234g xanthan gum을 녹이고 0.5g의 surfactant를 첨가하여 만든 calcium chloride 용액도 준비하였다. Bead 제조에서와 반대로 sodium alginate 용액을 잘 회전시키고 여기에 calcium chloride 용액을 주사기로부터 drop으로 떨어뜨려서 완전구형의 캡슐을 제조하였다(13-14).

캡슐 내에 미생물을 고정화시키는 방법은 다음과 같다. Shaking incubator 내에서 30 $^\circ\text{C}$  120rpm의 조건으로 *A. niger*를 48시간 성장시킨 후 배지용액 3ml을 채취하고 원심분리(3,600rpm)를 통하여 하부의 농도가 235g/l 인 균주액을 분리해 낸다. 분리해 낸 균주액 1ml를 50ml의 calcium chloride 용액에 섞는다. *A. niger*가 섞인 calcium chloride용액을 사용하여 위에서 서술한 방법과 같이 고정화 캡슐을 제조한다.

### Bead의 제조

Bead를 제조하기 위해서 무게비로 0.6% sodium alginate 용액과 1.0%  $\text{CaCl}_2$  용액을 준비하였다. 캡슐 제조공정과는 반대로  $\text{CaCl}_2$  용액을 잘 회전시키고 여기에 sodium alginate 용액을 주사기로부터

방울로 떨어뜨려서 10분간 반응시켜서 bead를 제조하였다. 제조된 bead는 멸균된 증류수로 세척하였다. 세척한 bead를 HEPES 완충용액(pH 7.2)에서 10분 동안 수축시켰다.

분석법

구연산 농도는 Marier와 Boulet의 방법(16)을 이용하여 측정하였다. 즉 1ml의 시료에 1.3ml의 pyridine을 섞어 1분간 세계 흔들어 준 후 5.7ml acetic anhydride를 추가로 섞어 교반한 후 30°C 항온조에서 30분간 반응시켜 발색시켰다. 발색된 시료의 O.D.는 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu 1201)를 이용하여 420nm에서 측정하여 검량곡선으로부터 구연산의 농도를 환산하였다.

Sugar의 농도는 Dubois et al.의 방법(17)을 이용하여 측정하였다. Sugar가 0~70mg/ℓ의 농도로 포함된 sample 2ml에 0.05ml phenol과 5ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 충분히 섞었다. 온도가 30°C로 유지되는 항온조 내에서 이 혼합물을 20분간 보관한 후에 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu 1201)를 사용하여 파장 490nm에서 혼합물의 O.D.를 측정하여 검량곡선으로부터 sugar 농도를 환산하였다.

결과 및 고찰

캡슐내 *A. niger*의 고정화 및 성장양태

Calcium alginate 캡슐내에 *A. niger*를 고정화하여 캡슐의 상태와 미생물의 성장상태를 관찰하기 위해서 재료 및 방법에서와 같은 방법으로 고정화캡슐 100개를 제조하여 진탕배양기에서 균주를 성장시키며 상태를 관찰하였다.

Fig. 1에서 볼 수 있듯이 2일 경과 후 균사는 캡슐내부로부터 밖으로 많이 뻗어 나와 있으며 4일 후는 그 정도가 심화되었다. 이 현상은 *S. cerevisiae*가 캡슐 내부에 완전 격리되는 것과는 또 다른 형태이다. *A. niger*는 곰팡이의 한 형태로서 크기는 길이가 50~500μm이고 반경은 5~150μm로서 SEM 사진으로 관찰된 캡슐 막 공극의 평균직경 3~4μm보다는 훨씬 크다.(18)

그러나 *A. niger*의 균사가 캡슐막의 공극을 통하여 배지 속으로 뻗어나가 마치 캡슐에 곰팡이가 심어진 것과 같은 형태로 자라게 되며, 캡슐 내부에 고정화 하더라도 배양중에 균사가 캡슐 벽을 뚫고 캡슐 밖을 둘러싸고 자라게 된다. 따라서 곰팡이류인 *A. niger*를 고정화하는 경우는 *S. cerevisiae*와 달리

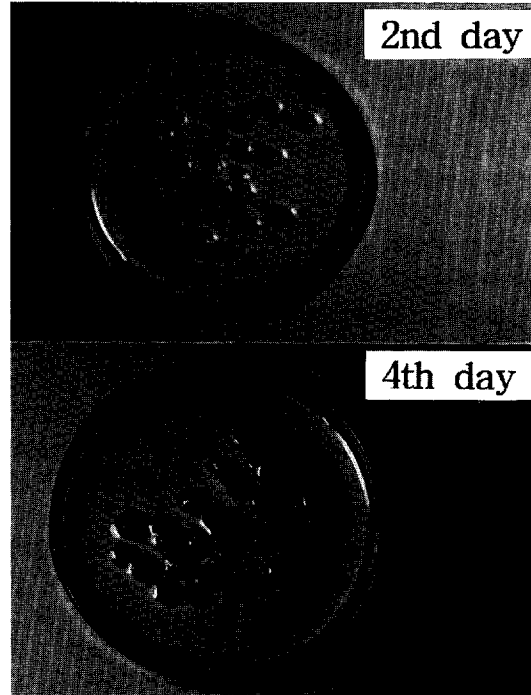


Fig. 1. The growth of *A. niger* at the inside of capsule.

영양소나 산소공급 등 성장초기와 성장후기의 율속단계가 달라질 것으로 사료된다. 즉 초기에는 *S. cerevisiae*의 경우와 같이 캡슐막을 통한 물질전달이 주요과정이 될 수 있고 후기에는 배양액으로부터 캡슐 바깥 벽면을 둘러싸고 있는 *A. niger*로의 전달현상이 주요과정이 될 수 있다.

고정화 캡슐배양과 현탁배양

고정화 캡슐의 구연산 생산양태를 살펴 보기 위해서 캡슐을 100개 제조하여 플라스크 배양을 통하여 구연산을 생산하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 14일 경과 후 구연산은 0.9g/ℓ였으며 pH는 4.86에서 2.20까지 떨어졌다. Sugar의 소모량은 16.1g/ℓ이었으며 캡슐의 크기는 약 3mm에서 캡슐 주위에 자라나 있는 mycelia의 크기를 포함해 약 9mm까지 커져 있음을 관찰할 수 있었다. Sugar의 소모량에 대한 구연산의 생산성은 0.056g citric acid/g sugar로서 상당히 낮은 편이었다. 이는 산업화 균주와 같이 생산성이 뛰어난 균주가 아니었으므로 sugar가 구연산의 생산보다는 *A. niger*의 성장에 소모되었기 때문

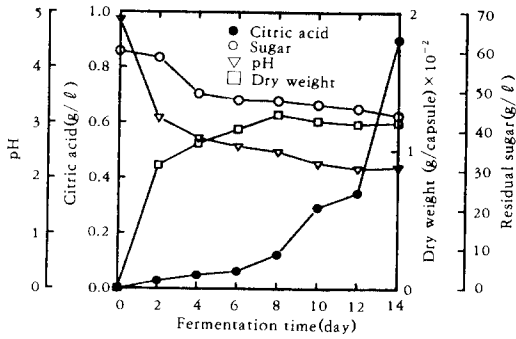


Fig. 2. Citric acid production and sugar consumption in the flask culture using encapsulated *A. niger*.

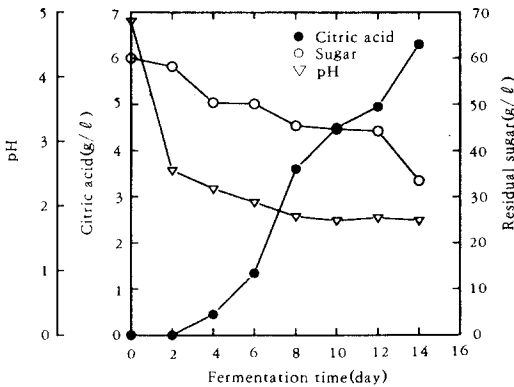


Fig. 3. The concentration of citric acid, sugar and pH variation in shake flask fermentation.

으로 사료된다. Fig. 2에서와 같이 8일 이후부터 생산성이 높아지고 있음을 관찰할 수 있었다. *A. niger*가 질산암모늄을 소모하면서 성장하여 약 8일 이후가 되면 질산암모늄의 결핍이 일어나고 따라서 성장이 제한되기 때문에 생산량이 많아지는 것으로 사료된다.

고정화 캡슐의 발효조건과 동일한 조건에서 배양액 1ml을 배양 배지에 접종하고 현탁배양을 하여 그 생산성을 살펴 본 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 14일 경과 후 구연산 생산이 6.3g/l로 고정화 캡슐을 사용할 경우의 0.9g/l 보다 높게 나타났다. 이는 현탁배양을 하는 경우 배지 100ml에 배양액 1ml을 투입하였으나 고정화 캡슐의 경우는 캡슐 100개에 배양액이 0.033ml로 현탁배양의 경우에 비해 약 30배 정도 낮게 투입되었다. 따라서 고정화된 경우의

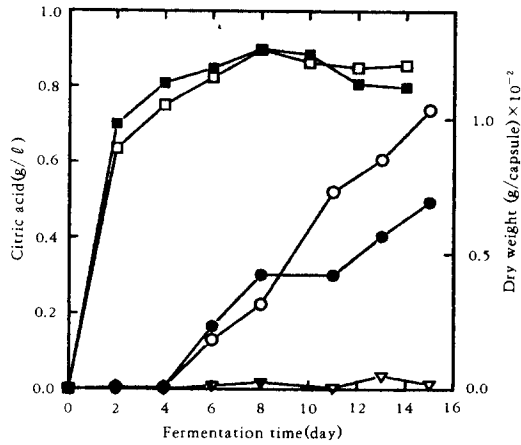


Fig. 4. The effect of ammonium nitrate on citric acid production using encapsulated *A. niger*.

○:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2.5g/l (M1), ●:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.5g/l (M2), ▽:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0g/l (M3), □: Dry Weight (M1), ■: Dry Weight (M1)

생산량은 현탁배양의 경우보다 낮게 나타나고 있는 것으로 사료된다.

배지의 질소원 변화에 따른 영향

구연산은 탄소원이 축적되고 질소원이 제한된 상태에서 생산되는데 질소원 공급상태에서 세포의 성장이 일어나고 구연산 생산은 저하되며 (19) 질소원이 완전히 소모되면 세포의 성장이 멈추고 구연산 생산이 일어난다. 따라서 본 실험에서는 질소원인 질산암모늄의 농도를 변화시키면서 고정화 캡슐 내의 *A. niger* 상태와 구연산 생산을 살펴 보았다. 캡슐 50개를 제조한 후 배지 50ml에 캡슐을 넣고 초기 pH를 3.5로 하여 구연산을 생산하였다.

Fig. 4에서 볼 수 있듯이 질산암모늄의 농도가 2.5g/l 인 (M1) 배지에서는 초기 pH 3.5에서 15일 경과 후 pH는 2.28로 떨어졌으며 구연산은 약 0.7g/l 생산되었다. 질산암모늄의 농도가 1.25g/l 인 (M2) 배지에서는 pH가 3.5에서 2.28까지 떨어졌으나 구연산은 0.5g/l 만 생성되었고, 질산암모늄의 농도가 0g/l 인 (M3) 배지에서는 pH가 3.5에서 15일 경과된 후에도 pH가 3.24로 거의 떨어지지 않았으며 구연산은 거의 생산되지 않았다. M2 배지에서 8일까지는 구연산 생산성이 M1 배지보다 약간 높으나 8일 이후부터는 M1 배지가 M2 배지보다 40%

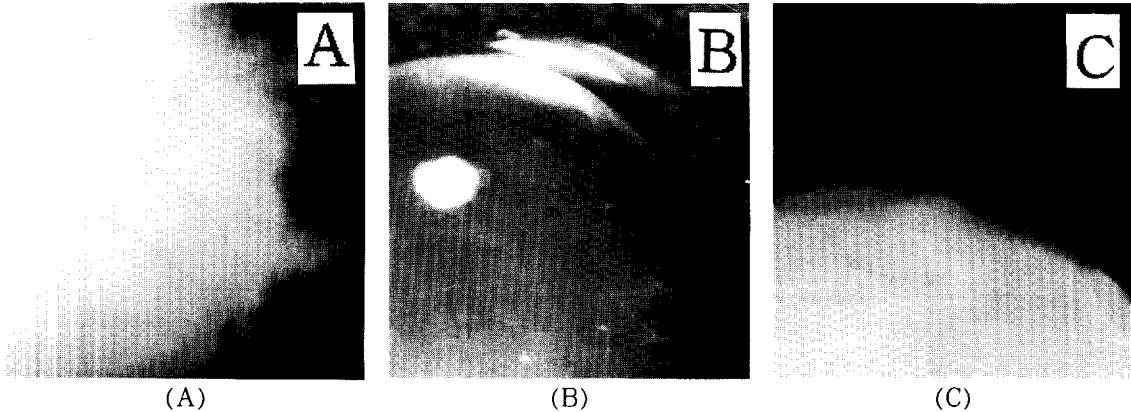


Fig. 5. The state of encapsulated *A. niger*

A : after 20 days cultivation in M1 medium containing  $2.5g/\ell$  of  $NH_4NO_3$ .

B : after 20 days cultivation in M3 medium containing  $0g/\ell$  of  $NH_4NO_3$ .

C : after 15 days cultivation in M3 medium, which had been grown for 6 days in M1 medium.

정도 높게 나타남을 관찰할 수가 있었다.

즉 질산암모늄이 낮을수록 생산이 높아진다는 것과 같이(20) 일정한 탄소원에 질소원이 많이 포함된 M1 배지 균사가 성장하는 8일까지는 질소원이 적게 포함된 M2 배지에서보다 생산이 작게 된다. 그러나 M1 배지에서 균사가 빠른 속도로 성장을 하고 이 과정에서 배지속의 질소원이 충분히 고갈되었으므로 8일 이후부터는 M1 배지에서의 생산량이 많아짐을 알 수 있었다. 질산암모늄이 전혀 포함되어 있지 않은 M3 배지에서는 곰팡이가 성장하지 않고 pH도 떨어지지 않았으며 구연산도 생산되지 않음을 관찰할 수가 있었다.

M1과 M3에 대한 캡슐의 상태를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5의 A는 M1 배지에서 약 20일 동안 경과된 후의 사진을 나타내었다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 균사가 캡슐 밖으로 스며나와 캡슐 외부 벽면에 부착된 형태로 있음을 관찰할 수 있었다. M2의 경우도 M1과 비슷한 모양을 하고 있음을 관찰하였다. Fig. 5의 B는 M3 배지에서 약 20일 경과된 후의 캡슐의 사진이다. 사진에서 볼 수 있듯이 캡슐 속에 균사가 거의 자라지 않았고 실처럼 균사가 몇 가닥 있음을 알 수가 있었다. 따라서 질산암모늄은 균사의 성장에 필수 요인임을 알 수 있었다. Fig. 5의 C는 M1 배지에서 6일간 성장한 뒤 질산암모늄이 들어 있지 않은 M3 배지에서 15일간 배양된 후의 캡슐의 상태를 나타내었다. 캡슐 속의 균사가 더 이상 밖으로 자라 나오지 않았음을 관찰할 수 있었다. 따라서 질소원은 성장에 필요한 요소이므로 중

분히 높은 질소 농도에서 성장이 많이 이루어진 후 생산성도 높아짐을 알 수 있었다.

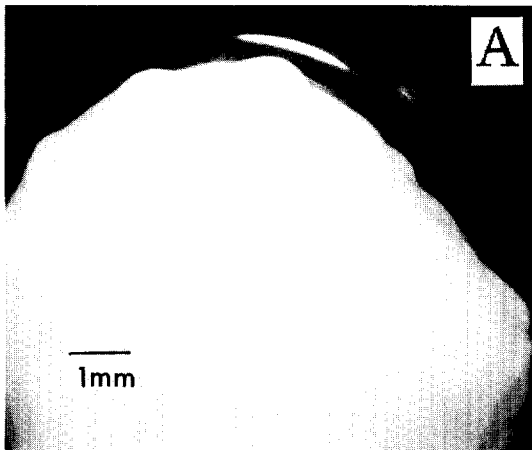
#### 캡슐 개수에 따른 영향

캡슐의 팽창을 막고 강도를 높이기 위해서 배지에  $CaCl_2$ 를 첨가하였으며 동일한 배지에 캡슐 개수를 증가시켜 보았으며 이때의 캡슐의 상태와 구연산 생산성을 관찰하였다. 고정화 캡슐을 100개 제조하여 배지 100ml에  $CaCl_2$ 를  $0.5g/\ell$ 를 첨가한 후 초기 pH 4.4에서 실험을 하였으며 12일 경과된 후의 pH는 1.77까지 낮아졌다. 10일 이후 생산성이 급격히 높아져 있음을 관찰할 수 있었고 캡슐 안에서 밖으로 균사가 자라나와 캡슐을 둘러싸고 있어 캡슐의 크기는 3mm에서 8mm까지 커져 있음을 관찰하였다.

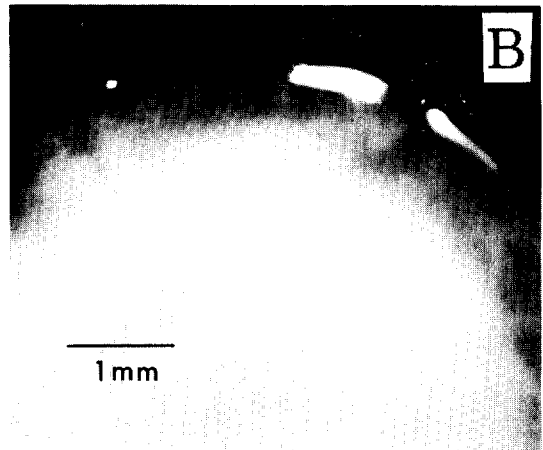
Table 1에  $CaCl_2$ 가 포함된 배지에서 캡슐 개수를 300개, 500개, 1,000개로 변화시키면서 14일 경과된 후의 캡슐 개수에 대한 구연산 생산 및 sugar 소모량을 나타내었다. Table 1에서 볼 수 있듯이 캡슐의 개수가 증가할수록 구연산의 생산성은 감소하였고 최종 pH는 높게 나타났으며 캡슐의 크기는 작아짐을 관찰할 수 있었다. 캡슐 개수가 300개, 500개 일 경우는 캡슐의 크기가 서로 비슷하였고 1,000개 일 때의 크기는 초기 캡슐의 크기와 차이가 별로 없었다. 1,000개일 때 sugar는 84%나 소모되었지만 생산은 거의 되지 않았음을 관찰할 수 있었다. 이때의 캡슐의 상태를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 캡슐의 개수가 증가할수록 더어려 형

Table 1. Effect of number of ca-alginate capsule in the flask on citric acid production.

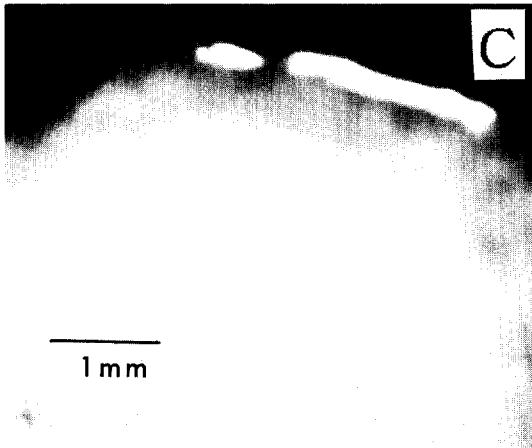
Ca-Alginate capsule number/100ml	Citric acid (g/ℓ)	Consumed sugar(g/ℓ)	Yield to sugar consumed(%)	Capsule size(mm)	pH	Dry weight (g/capsule)
100	2.48	42.33	5.85	3-8	1.98	0.0132
300	1.35	46.52	2.90	3-5.5	2.06	0.0075
500	0.95	41.96	2.26	3-5	2.30	0.0056
1,000	0.17	50.75	0.33	3-3.5	3.05	0.0012



(A)



(B)



(C)

Fig. 6. The state of encapsulated *A. niger* after 17 days cultivation in the medium containing  $\text{CaCl}_2$ .

- A : 100 capsules/100ml,  
 B : 300 capsules/100ml,  
 C : 500 capsules/100ml

태가 아닌 솜털처럼 군사가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 용존된 산소와 탄소원이 일정하기 때문에 개수가 증가할수록 단위 캡슐당 균체증식에 필요한 영양기질이 고갈되고 충분한 산소공급의 부족으로 인하여 생산성은 감소되는 것으로 보여진다. 또한 캡슐의 상태는 캡슐이 차지하는 공간의 부족과 산소의 부족으로 인하여 캡슐 개수가 증가할수록 Fig. 6의 mycelia가 솜털처럼 나타나게 되는 것으로 여겨진다.

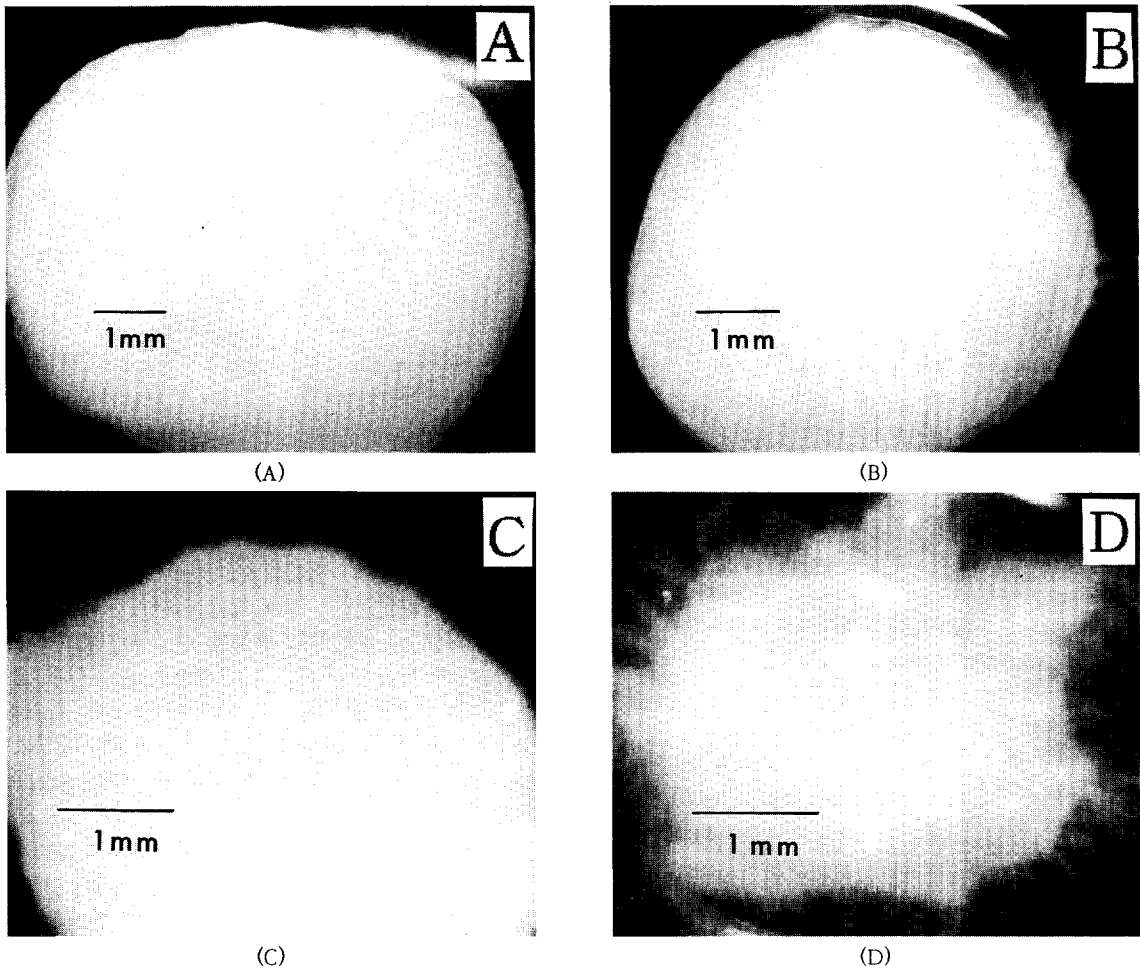
본 질의 연구에서는 제한된 공간과 제한된 산소의 양에서 캡슐수 즉 균의 양이 많아지면 단위 균주당의 산소량이 작아지므로 섭취한 영양분 중 생산에 기여 하는 분율은 지극히 작고 성장에 기여하는 분율이 많아지기 때문에 캡슐수가 증가할수록 생산성이 떨어지는 것으로 사료된다.

#### Bead 개수에 따른 영향

캡슐의 경우와 비교 관찰해 보기 위해서 일반적으로 고정화에 많이 사용되고 있는 bead를 이용하였으며  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가한 배지에 bead의 개수를 증가시키

Table 2. Effect of number of ca-alginate bead in the flask on citric acid production.

Ca-Alginate capsule number/100ml	Citric acid (g/l)	Consumed sugar(g/l)	Yield to sugar consumed(%)	Bead size(mm)	pH	Dry weight (g/bead)
100	1.09	35.75	3.04	3-8	2.31	0.0130
300	1.91	43.85	4.36	3-5	2.12	0.0070
500	1.77	45.05	3.92	3-4.5	2.11	0.0062
1,000	0.617	34.19	1.80	3-3.5	2.59	0.0047

Fig. 7. The state of entrapped *A. niger* after 13 days cultivation in the medium containing  $\text{CaCl}_2$ .

A : 100 beads/100ml, B : 300 beads/100ml, C : 500 beads/100 ml, D : 1,000 beads/100 ml

면서 이때의 bead의 상태와 구연산 생산성을 관찰하였다.  $\text{CaCl}_2$ 가  $0.5\text{g/l}$  들어 있는 배지 100ml에 bead 100개를 넣고 초기 pH 4.5에서 실험을 하였으며 13일 경과된 후의 pH는 2.31까지 낮아졌다.

캡슐 100개를 고정화한 경우와 비교하면 캡슐의 경우가 pH도 낮게 유지되고 sugar의 소모량도 높고 생산성도 높게 나타남을 관찰할 수 있었다. 이는 일정한 배지에 존재하는 용존산소와 기질이 균체로 이

동하는데 받게 되는 저항이 캡슐의 경우가 bead의 경우보다 작기 때문이며 또한 캡슐 내부 공극이 bead보다 커 균사가 자랄 수 있는 환경이 좋은 것으로 사료되기 때문이다. 따라서 bead의 개수를 300개, 500개, 1,000개로 각각 증가시켜 구연산의 변화를 살펴보았다.

Table 2에 CaCl<sub>2</sub>가 포함된 배지에서 13일 경과된 후의 bead에 대한 구연산 생산 및 sugar 소모량을 나타내었다. Bead 개수가 300개일 때가 100개일 때의 경우보다 생산성이 높게 나타났고, 1,000개일 때는 캡슐의 경우와 마찬가지로 생산성이 낮게 나타나고 있었다. Table 2에서 볼 수 있듯이 bead 300개일 때 가장 높은 생산성을 나타내었으며 그 이상 개수가 증가할수록 sugar 소모 수율도 감소하고 생산성도 감소함을 관찰할 수 있었다. 이는 *A. niger* (TMB 2022)를 젤 bead에 고정화시켜 bead의 개수를 증가시키면서 구연산을 생산한 문헌(21)과 경향이 일치하였다. 즉 문헌에서는 10g의 bead보다 20g의 bead에서 생산성이 높게 나타났고 30g, 50g, 100g으로 증가시킴에 따라서 생산성이 감소하고 sugar 소모 수율도 낮아졌다. 13일 경과한 후의 bead 개수 각각에 대한 상태를 Fig. 7에 나타내었다.

Fig. 7에서 볼 수 있듯이 100개, 300개인 경우는 완전한 pellet를 형성하였고 500개, 1,000개인 경우는 mycelia가 솟털처럼 bead 주위에 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 bead의 개수가 증가할수록 bead가 차지하는 공간의 부족과 산소의 부족현상이 심화되어 bead 표면에 Fig. 7의 mycelia가 솟털처럼 나타나게 되는 것으로 사료된다.

CaCl<sub>2</sub> 첨가 시기에 따른 영향

캡슐 막의 강도를 높이고 팽창을 방지하기 위해서 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하였으며, 특히 캡슐 밖으로 새어 나오는 균사를 캡슐 내에 고정화시키기 위해서 CaCl<sub>2</sub>의 첨가 시기를 달리해 보았다. 캡슐을 각각 100개씩 pH 4.5인 배지 100ml에 투입하여 구연산을 생산하였다. CaCl<sub>2</sub>를 발효배지에 처음부터 0.5g/l를 투입한 경우와 7일 경과 후 배지에 CaCl<sub>2</sub>를 투입한 경우에 대한 생산성을 Fig. 8에 나타내었다.

Fig. 8에서 볼 수 있듯이 초기에 CaCl<sub>2</sub>를 투입한 경우의 13일째 구연산 생산은 6.26g/l 이고 sugar 소모량은 41.4g/l 이며 생산 수율은 15% 이었다. 7일째 CaCl<sub>2</sub>를 투입한 경우의 구연산 생산은 7.66g/l, sugar 소모량은 37.2g/l 이고 생산 수율은 21%

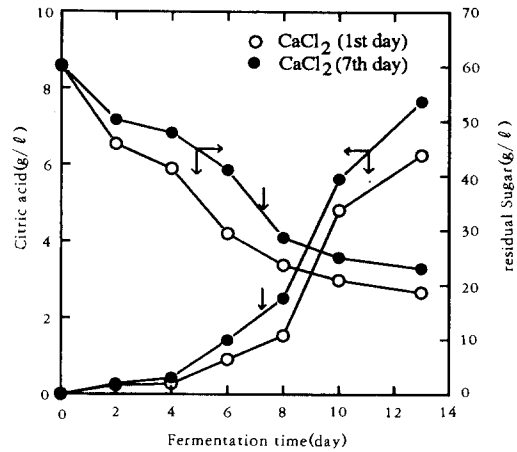


Fig. 8. The citric acid production by the encapsulated *A. niger* in the time-variable medium.

이었다. 따라서 CaCl<sub>2</sub>를 7일째에 투입함으로써 13일째 생산수율을 기준으로 40% 증가시킬 수 있었다. 이는 초기에 투입된 칼슘 이온은 캡슐막의 팽창을 초기부터 방지하게 되지만 초기에 칼슘을 투입하지 않고 7일 후에 투입하면 7일간 막이 팽창하여 막의 두께가 얇아지고 막 내부의 공극이 약간 팽창하게 되므로 7일 후 칼슘이 첨가되어도 막은 약간 팽창한 상태로 유지된다. 따라서 세포에 필요한 영양물질이 막을 통하여 전달되는 속도가 증가되므로 7일째 칼슘을 투입하는 경우가 생산성이 높아지는 것으로 사료된다.

캡슐의 경우와 비교, 관찰하기 위해서 실험 방법을 동일하게 하여 배지 100ml에 bead를 각각 100개, 300개를 투입하여 구연산을 생산하였다. 역시 CaCl<sub>2</sub> 투입시기를 달리하였으며 이에 따른 구연산의 생산량 변화를 Fig. 9에 나타내었다. Bead 100개를 CaCl<sub>2</sub>가 처음부터 들어 있는 배지에서 투입하여 구연산을 생산하는 경우의 생산량은 6.35g/l 이고 sugar 소모량은 40.8g/l 이며 생산수율은 15%로 나타났으며 7일 후에 투입한 것의 생산은 6.53g/l, sugar 소모량은 37.8g/l, 생산수율은 17.5%로 나타났다. Bead 300개를 배지에 투입한 경우는 CaCl<sub>2</sub>가 처음부터 들어있는 경우의 생산수율이 18% 이고 7일째 CaCl<sub>2</sub>를 투입한 경우의 생산수율은 21%로 7일째 CaCl<sub>2</sub>를 투입함으로써 생산수율을 약 16.7% 증가시킬 수 있었다. 따라서 bead의 개수가 100개보다는 300개일 때의 구연산 생산량이 크게 나타났



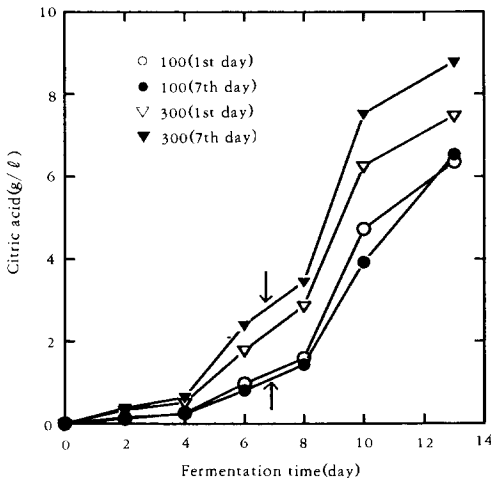


Fig. 9. The citric acid production by the entrapped *A. niger* in the time-variable medium.

고  $\text{CaCl}_2$ 의 투입시기를 달리하면은 생산량 증가에 미치는 효과가 더 크게 나타남을 알 수 있었다. 이는 캡슐과 마찬가지로  $\text{CaCl}_2$  투입시기를 달리하면 bead의 내부 공극에 영향을 미쳐 차이가 나는 것으로 사료된다.

캡슐에 *A. niger*를 고정화한 경우와 bead에 고정화한 경우의 생산성을 비교하여 보았다. Fig. 8에서 캡슐 100개를 고정화하여  $\text{CaCl}_2$ 를 초기에 투입하는 경우 13일째 구연산 생산은  $6.26\text{g}/\ell$  이고 sugar 소모량은  $41.4\text{g}/\ell$  이며 생산수율은 15%였다. Fig. 9에서 bead 100개를 고정화하여  $\text{CaCl}_2$ 가 처음부터 들어있는 배지에서 생산하는 경우 구연산 생산은  $6.35\text{g}/\ell$  이고 sugar 소모량은  $41\text{g}/\ell$  이며 생산수율은 약 15%로 캡슐의 경우와 같게 나타남을 관찰할 수 있었다. 이것은  $\text{CaCl}_2$ 를 초기에 투입하는 경우 캡슐 막이 수축하여 bead의 경우와 비슷하게 나타나는 것으로 사료된다.

그러나  $\text{CaCl}_2$ 를 7일째 투입하는 경우는 6일째부터 생산되는 구연산의 생산이 캡슐의 경우가 bead보다 높게 나타났다. 즉 10일째는 44%, 13일째는 17% 증가함으로써 캡슐의 경우가 평균 30% 높게 나타남을 관찰할 수 있었다. 이때의 생산성 비교를 Fig. 10에 나타내었다.  $\text{CaCl}_2$ 를 7일째 투입하는 경우는 초기 7일 동안 곰팡이가 성장을 충분히 하여 캡슐 내부에서 충전된 곰팡이의 양이 bead의 공극 사이에 충전된 곰팡이의 양보다 많으며 캡슐막을 통

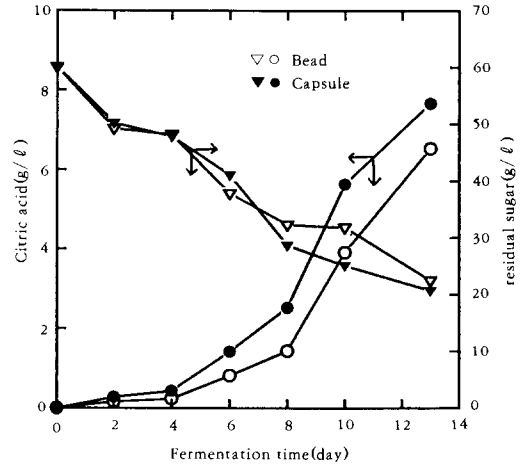


Fig. 10. The enhancement of citric acid production by using encapsulated *A. niger*.

한 전달저항이 bead 내부의 전달저항보다 작기 때문에 캡슐을 이용하는 경우의 생산성이 bead를 이용하는 경우의 생산성보다 큰 것으로 나타났다.

#### T-Flask를 이용한 구연산 생산

고정화 캡슐을 이용하여 플라스크 배양을 할 경우 생산성이 낮게 나타남을 관찰할 수 있었다. 고정화 캡슐의 경우 parafilm으로 완전 밀봉한 경우의 생산량과 원면으로 밀봉한 경우의 생산량 차이가 2.53배로 나타났는데 이는 산소공급에 따라 영향을 받고 있는 것으로 여겨졌다. 따라서 본 실험에서는 산소공급의 효과를 높이기 위하여 삼각플라스크에 'T'자 adaptor를 붙이고 adaptor의 양면을 glass filter로 막은 다음 pH 4.5인 배지 100ml에 캡슐을 100개 제조하여 넣은 후 구연산을 생산하였다. 구연산 생산과 sugar 소모량에 대한 결과를 Fig. 11에 나타내었다.

Fig. 11에서 구연산 생산은  $9.8\text{g}/\ell$  이고 sugar 소모량은  $45.1\text{g}/\ell$  이며 생산수율은 21.7%로 나타났다. Parafilm으로 밀봉하고 생산하는 경우의 구연산 생산은  $0.9\text{g}/\ell$ 로 T-flask를 이용한 경우의 생산속도가 11배 정도 높게 나타났다. 또한 이를 생산수율( $\Delta P/\Delta S$ )로 표시하면 3.88배 증가하였다. 이는 산소공급이 생산성에 영향을 크게 미치고 또한 섭취한 탄소가 생산에 쓰이는 율도 높아지고 있음을 관찰할 수가 있었다. 따라서 3상 반응기를 이용하여 산소 공급을 충분히 할 경우에 상당히 높은 생산을

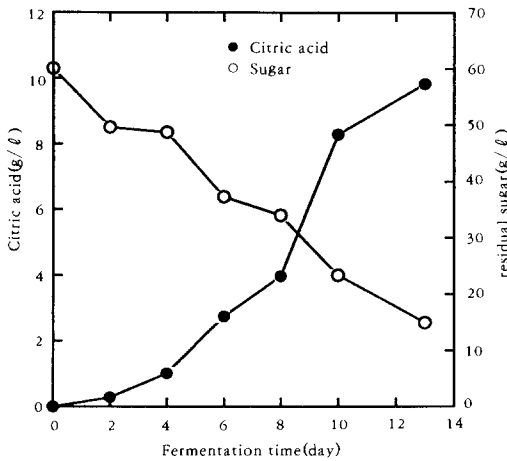


Fig. 11. Citric acid production and sugar consumption in the T-flask cultivation using encapsulated *A. niger*.

얻을 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

구연산을 생산하고자 캡슐 내부에 *A. niger*를 고정화하여 배양하는 경우 곰팡이가 뺏어나와 캡슐 벽면위에서 성장하게 된다. 배지중의 탄소원이나 산소가 부족하면 캡슐벽 밖에 나온 균사가 느슨하게 자라게 되며 탄소원과 산소가 충분하면 캡슐벽 밖의 균사는 단단하게 뭉치며 생산성과 생산수율이 매우 높아진다. 즉 배지의 단위 부피당 적절한 캡슐수가 존재한다. 배양중에 캡슐막이 팽창하는 현상은 배지중에 CaCl<sub>2</sub>를 첨가함으로써 방지할 수 있다. 배지중에 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하는 시기에 따라 생산성은 영향을 받으며, 배양초기에 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하는 경우보다 배양 7일째에 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하는 경우가 생산수율이 약 40% 정도 증가하였다. 고정화 캡슐을 이용하여 플라스크 배양으로 구연산을 생산하는 경우 생산수율은 산소공급에 큰 영향을 받는다. Parafilm으로 밀봉된 플라스크 대신 산소공급이 원활한 T-flask를 사용하면 생산량은 11배 생산수율(4p/4s)은 3.8배 증가하였다. *A. niger*를 캡슐에 고정화 배양하여 구연산을 생산하는 경우는 bead에 고정화 배양하여 생산하는 경우보다 6일째부터 13일째 사이에 평균 30% 이상의 구연산 생산량 증가가 있었다.

감 사

본 연구를 위하여 연구비를 지원해 준 생물공정연구센터에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. G. M. Black, C. Webb, T. M. Matthews and B. Atkinson(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 134.
2. A. L. Van Wezel(1967), *Nature*, **216**, 64.
3. M. Kierstan and C. Bucke(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 387.
4. P. S. J. Cheetham, K. W. Blunt and C. Bucke (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2155.
5. K. Ku, M. J. Kuo, J. Delente, B. S. Wildi and J. Feder(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 79.
6. T. Yoshioka, R. Hirano, T. Shioya and M. Kako(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 66.
7. M. V. Sefton, R. M. Dawson, R. L. Broughton, J. Blyzniuk and M. E. Sugamori (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1135.
8. H. Kurosawa, N. Nomura and H. Tanaka (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 716.
9. T. M. S. Chang(1972), Charles C., Thomas Pub., Springfield, Illinois.
10. F. Lim and A. M. Sun(1980), *Science*, **210**, 908.
11. F. Lim(1984), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**, 81.
12. S. C. Nigam, I. F. Tsao, A. Sakoda and H. Y. Wang(1988), *Biotechnol. Techniques*, **2**, 271.
13. S. H. Cheong, J. K. Park, B. S. Kim and H. N. Chang(1993), *Biotechnol. Techniques*, **7**, 879.
14. S. H. Cheong, J. K. Park and H. N. Chang (1993), *J. KICHe.*, **31**, **6**, 788.
15. B. H. Chung(1987), Ph. D. Thesis, KAIST.
16. J. R. Marier and M. J. Boulet(1958), *J. Dairy Sci.*, **41**, 1683.
17. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and M. Fred(1956), *Anal. Chem.*, **28**, 350.
18. J. K. Park(1994), Bioprocess Engineering Research Center, Final report.

19. B. Kristiansen and C. G. Sinclair(1979),  
*Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 297.
20. J. Vaija, Y. Y. Linko and P. Linko(1982),

- Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**, 51.
21. S. S. Tsay and K. Y. To(1987), *Biotechnol.*  
*Bioeng.*, **29**, 297.